

דוח שנה שנייה תוכנית מחקר-14-0976-203

שילוב של גישות גנומיות פיזיולוגיה של הצמח וטיפוח קלאסי להחדרת מספר תכונות חקלאיות חשובות

ברימון למערך הטיפוח

Combination of genomics, plant physiology and plant breeding in order to integrate agricultural traits the pomegranate breeding program

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

| | |
|---|-------------|
| היחידה לגנומיקה, מכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי | עמיר שרמן |
| המחלקה למטעים, מרכז מחקר נוה יער, מנהל המחקר החקלאי | דורון הולנד |
| היחידה לגנומיקה, מכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי | רון אופיר |

Amir Sherman, Genomic unit Plant Sciences Institute, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: asherman@agri.gov.il

Doron Holland, Fruit Tree Sciences, Newe Ya'ar Research Center ARO, P.O.B.1021 Ramat Ishai 30095 Email: vhhollan@volcani.agri.gov.il

Ron Ophir, Genomic unit Plant Sciences Institute, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: ron@agri.gov.il

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

חתימת החוקר

4. תקציר מדעי:

מבוא: הרימון הינו גידול מטעים הצובר חשיבות הולכת ועולה בישראל ובעולם. השונות לתכונות פרי ברימון היא רבה ומתבטאת בגודל, תכולת סוכר, טעם, הבשלה, צבע, צורת הפרי, קליפה, מבנה העץ ועוד. בנווה יער נרכש ניסיון רב בהשבחה אולם הטיפוח בעזרת סמנים ברימון הוא עדיין בתחילת דרכו. קבוצתו של דורון הולנד היא מהמובילות בתחום. האוסף הגנטי של זני הרימון שנבנה בנווה יער, מכיל מספר רב של טיפוסים שונים שמקורם מאזורים גיאוגרפיים שונים. הכלאות מכוונות בעצי פרי הן תהליך ארוך ומגבל בהיקפו. סריקה פנוטיפית וגנוטיפית של אוסף גנטי של רימון יאפשר לזהות סמנים למספר תכונות חקלאיות בזמן קצר ולהחדיר אותן לזנים שיהיו בעלי יתרון איכותי.

מטרות המחקר שנה שני

א. המשך אפיון של האוסף ברמה הפנוטיפית לתכונות איכות פרי.

ב. יצירת סדרת סמנים נרחבת לאוסף.

תוצאות שנה שניה: בשנה השנייה נמשך אפיון האוסף ברמה הפנוטיפית לתכונות איכות פרי שונות. בנושא ה GBS הצלחנו להתגבר על בעיות ברמת הדנא של שנה ראשונה והאוסף כולו הופק על ידינו, אבל אנליזת ה GBS לא בוצעה עדיין.

מבוא

הרימון הינו גידול מטעים הצובר חשיבות הולכת ועולה בישראל ובעולם. השונות לתכונות פרי ברימון היא רבה ומתבטאת בגדלים שונים, תכולת סוכר, טעם, הבשלה, צבע, צורת הפרי, קליפה, מבנה העץ ועוד. בנווה יער נרכש ניסיון רב בהשבחה אולם תהליך הטיפוח בעזרת סמנים ברימון הוא בתחילת דרכו (קבוצתו של דורון הולנד היא מהמובילות בתחום זה). האוסף הגנטי של זני הרימון שנבנה בנווה יער, מכיל מספר רב של טיפוסים שונים (למעלה ממאה) שמקורם מאזורים גאוגרפיים שונים ומגוונים מישראל ובעולם (Holland et al 2006). האוסף אופיין לתכונות שונות ומהווה אחד המקורות העיקרים לצרכי בידוד תכונות חשובות לטיפוח כמו צבע הקליפה והגרורים, גודל פרי, איכות פרי יבול גבוה, עמידות למחלות ומזיקים, עמידות פרי לאחסון ועוד. עולה השאלה כיצד משתמשים באוסף בצורה יעילה וממצים ממנו יכולות כיצד לזהות ולאפיין תכונות בעלות חשיבות חקלאית ברות העברה (בעזרת סמנים מולקולאריים) כדי לאפשר החדרה של תכונות אלו לתהליך הטיפוח.

בשנים האחרונות פותחו אמצעים מולקולריים רבים לחיפוש שונות (סמנים) ברמה הגנומית בכל מערכת ביולוגית תוך שימוש בריצוף בנפח גבוה (Davey et al, 2011). בעזרת גרנט קודם של המדען פיתחנו תשתית גנומית רחבה לרימון הכוללת טרנסקריפטומים של ארבעה זנים שונים ממגוון רחב של רקמות ומאגר גדול של אלפי סמנים. בנוסף אופיין אוסף הרימון על ידי סט סמנים של 480 סמנים וזהה המבנה הגנטי של אוסף זה. בהשבחת רימון בארץ ישנה חשיבות מרובה לתכונות הקשורות ביכולת להתחרות בשוקי העולם מבחינת יצוא. לפיכך לתכונות הקשורות במועד ההבשלה הינן בעלות חשיבות מרובה. הבשלה לאורך תקופה ארוכה ככל האפשר היא יתרון בולט והיא אפשרית בתנאי הארץ. כבר היום יש זנים שניתן לשווק אותם מסוף יוני ועד נובמבר. אולם חלק ניכר מהזנים הללו איננו איכותי מספיק. יש צורך לשפר את הגודל של הפרי ואת יכולת השימור בקירור. שיפור צבע הגרעין והקליפה והורדת קושי הזרעים יכולים להפוך את הזנים הישראליים לאטרקטיביים במיוחד. כדי להתגבר על הבעיה של זמן הגידול ארוך בהשבחת עצי פרי והאמצעים הרבים הנדרשים לפיתוח אוכלוסיות אנו מתכוונים למצוא את הקשר בין סמן גנטי לתכונה על ידי ניתוח מספר רב של זנים מאוסף הרימון ובעזרת תהליך זה לנסות ולעקוף את בניית האוכלוסיות שהינו תהליך ארוך מאוד בעצי פרי. ניתוח מעין זה שמשלב קביעת פנוטיפים וגנוטיפים ואנליזה ביואנפורמטית מכונה בספרות (Khan MA and Korban SS, 2012) ; Genome wide association study (GWAS). בגישה זו מציאת הקשר סמן תכונה באינטגרציה של נתונים ממספר רב של פריטים בעלי רקע שונה אך שהמשתף ביניהם הוא תכונה מסוימת בהשוואה לקבוצה אחרת של פריטים שהמשתף ביניהם הוא מופע אחר של אותה התכונה.

אנו מעוניינים לשלב את הידע הביולוגי הרב והאוסף הגנטי הרחב יחסית שקיים בידינו על רימון עם טכנולוגיות גנומיות מתקדמות למיפוי שפותחן על ידינו על מנת לזהות סמנים צמודים לסדרה של תכונות חקלאיות שיאפשרו לנו ליצור זנים בעלי תכונות חקלאיות משופרות.

לאור זאת מטרת המחקר בשנה הראשונה היו:

א. איפיון האוסף למספר תכונות של איכות פרי.

ב. יצירת סמנים בנפח גבוה בעזרת GBS

פירוט עיקרי הניסויים:

העבודה אמרה להתרחש בשני ערוצים במקביל בערוץ האחד מתבצעות הערכות פנוטיפיות של האוסף לתכונות איכות פרי- טעם, רמת סוכר, חומציות יבול זמן הבשלה גודל פרי, צבע חיצוני ופנימי תכונות גרעין רך- קשה ועוד (הבדיקות הן כמותיות וחצי כמותיות ומתבצעות לאורך מספר שנים ומהוות בסיס לאפיון הפנוטיפי של האוסף. כדי לאפשר בשלב הבא חיבור עם סמנים בנפח גבוה. לאחר שהחלט בשנה הראשונה לעבור לגישת ה GBS במקום גכישת המיקרואררי שאותה פתחנו ובה השתמשנו בגרנטים קודמים איכות הדנא לא היתה מספקת ולא התאימה לשיטה החדשה שבה נדרש דנא איכותי רב מולקלרי. לאחר נסיון במספר רב של פרוטוקולים הצלחנו להפיק שוב את אוסף הרימון שהכ 192 דוגמאות בשיטה קלאסית של פנול כלורופום באופן ידני. בחלק מהדוגמאות נדרשנו להפיק פעמים ואו שלוש לאור זאת שדנא הרימון הוא הבעייתי ביותר מכל הצמחים שאתם אנחנו עובדים(מנגו תאנה אבוקדו לשון הפר עגבניה מלון ועוד) ומכיל כמויות גדולות של חומרים בלתי רצויים בהפקות שמקשות מאוד על העבודה וגורמות בהרבה מקרים לקבלת דנא לא איכותי. כרגע בידינו דנא איכותי ברמה גבוהה של האוסף כולו שעונה לדרישות הספק. עם זאת אנליזת ה GBS לא יצאה לדרכה ואנחנו בפגור חמור בלוח הזמנים של התוכנית כאשר החומר הביולוגי ממתין לבדיות הדנא שאמורות היו להיות פשוטות. בבדיקות ראשוניות שנעשו במעבדה של דורקון הולנד על סמך סמנים שיוצרו על ידינו לפני פרויקט זה באוסף ניתן לראות תאחיזה מבהקת למספר תכונות ותאחיזה חלשה למספר תכונות אחרות(Harel Beja at al, 2015).

דיון:

אפיון האוסף הגנטי המהווה נדבך חשוב בפרויקט בוצע וקיימות תוצאות איכותיות לגביו מה שמהווה בסיס מעלה לאנליזה גנטית של האוסף ובלעדיו הסמנים בפני עצמם הינם חסרי ערך עם זאת הנדבך השני שעליו עומד הפרויקט אינו בידינו. הנושא של הפקות הדנא שהווה בעיה בשנה שעברה נפתר ובידינו דנא איכותי. של אוסף הרמון כולו. עם זאת לא הגענו לשלב ה GBS והדבר מהווה בעיה חמורה בהתקדמות התוכנית. לאור זאת אני מציע לא לממן שנה שלישית לפרויקט זה עד שתוצאות ה GBS יהיו בידינו או עד בכלל. בכל מקרה אנו בתהליכי בצוע ואפשר יהיה לבדוק את טיבו של הפרויקט בסיום. אנחנו מניחים שברגע החלק הזה יסתיים נוכל להראות תוצאות איכותיות שניתוחם יאפשר החדרה של חלק מהתכונות לתוכנית הטיפוח. תוצאות אלו מלאו את כל מה שהבטח שיבצע בתוכנית מכיוון שהאנליזה הביולוגית כבר קיימת המפה הגנטית של הרמון שבו נעשה שמו שבנתונים פנוטיפים שישמשו גם בעבודה זו על סדרת סמנים שאנו בודדנו.

אמנם כמות הסמנים קטנה אך כבר שם ניתן לזהות תאחיזה ראשונית למספר תכונות כמו משקל פרי וחומציות נמצאה תאחיזה מבהקת באוסף שמהווה אינדיקציה לפוטנציאל של גישה זאת לשתי התכונות המרכזיות הללו לצרכי טיפוח.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. **הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

| מטרות המחקר | |
|-------------|---|
| 1 | איפיון האוסף למספר תכונות של איכות פרי. |
| 2 | יצירת סמנים בהנפח גבוה בעזרת GBS |

| עיקרי הניסויים והתוצאות. |
|--|
| <p>בשנה השנייה נאספו נתונים רבים על האוסף בנושא של תכונות איכות פרי כגון סוכר חומצה חוזק גרעין זמן השלה ועוד. השלמה הפקת דנא איכותי מכ200 דוגמאות של רמון לאחר מאמץ רב. לא נשלחו הדוגמאות לGBS.</p> |
| <p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>בחינת שהאנפורמציה הפנוטיפית לגבי האוסף הושגו המטרות אך יש עיכוב חמור בבצוע של ה GBS שהינן החלק השני של התוכנית שאמור להשתלב עם החלק הראשון. אני מציע להקפיא את הפרויקט בסוף שנה שנייה שלו לאור חוסר ההתקדמות שלו. מכיוון שחלק זה מבצע יהיה ניתן לקבל תואות איכותיות שיקיימו את כל ההתחייבויות שנלקחו בפרויקט זה.</p> |
| <p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?</p> <p>הבעיה המרכזית כרגע היא בפרויקט הינה העכוב בבצוע של החלק של ה GBS שמעכב את האנטגרציה של ייתר חלקי הפרויקט. זוהי למיטב הבנתי בעיה טכנית שניתן להתגבר עליה תוך זמן סבי אך מהוה אבן נגף להתקדמות הפרויקט כולו.</p> |
| <p>לפרסום</p> |

ספרות:

*Davey JW¹, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 17;12(7):499-510.

*Rotem Harel-Beja R, · Sherman A, Rubinstein M, · Eshed R, Bar-Ya'akov I, Trainin T, Ophir R and Holland D.(2015). A novel genetic map of pomegranate based on transcript markers enriched with QTLs for fruit quality traits. *TGG* 11:109-127.

*Holland D., Bar-Yaakov I., Trainin T. and Hatib K. 2006. Old deciduous fruit trees of the Rosacea family in Israel and their utilization in modern agriculture and breeding. *Israeli Journal of Plant sciences* 54: 169-177.

^Khan MA, and Korban SS. 2012. Association mapping in forest trees and fruit crops. *Journal of Experimental Botany*. DOI: 10.1093/jxb/ers105

פרסום הדוח : אני ממליץ לפרסם את הדוח